

## 炭素連結型シアリルガラクトース構築法の開発と機能性含フッ素ガングリオシドアナログの創製

|        |   |
|--------|---|
| 著者     | 渡邊 亨  |
| 号      | 52  |
| 学位授与番号 | 3972  |
| URL    | <a href="http://hdl.handle.net/10097/37688">http://hdl.handle.net/10097/37688</a> |

わたなべ とおる

氏 名 渡邊 亨

授 与 学 位 博士 (工学)

学 位 授 与 年 月 日 平成20年3月25日

学位授与の根拠法規 学位規則第4条第1項

研究科, 専攻の名称 東北大学大学院工学研究科 (博士課程) バイオ工学専攻

学 位 論 文 題 目 炭素連結型シアリルガラクトース構築法の開発と  
機能性含フッ素ガングリオシドアナログの創製

指 導 教 員 東北大学教授 正田 晋一郎

論 文 審 査 委 員 主査 東北大学教授 正田 晋一郎 東北大学教授 井上 祥雄  
東北大学教授 服部 徹太郎 主任研究員 袖岡 幹子

(独立行政法人 理化学研究所)

## 論 文 内 容 要 旨

【序論】ガングリオシドは一つ以上のシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称である。近年、ガングリオシドの多彩な機能が注目されており、シグナル伝達に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかし、ガングリオシドを生体内に導入するとシアリダーゼによって加水分解を受け、シアル酸残基が除去されてしまう。本研究では、シアリダーゼに加水分解されずにガングリオシドの機能を再現するアナログの創製を目指した。まずは最も単純なガングリオシドである GM4 をターゲットとし、 $\text{CF}_n\text{H}_{2-n}$ 基で連結した $\alpha(2,3)$ シアリルガラクトースを含む一連の GM4 アナログを設計した (Figure 1)。

フッ素原子を含むメチレン基はリン酸エステル酸素原子の等価体として利用されており、グリコシド結合においてもよい等価体と

なると考えた。これらのアナ

ログはシアリダーゼに分解

されないので、バイオプロ

ブやシアリダーゼ阻害剤へ

の応用が期待できる。

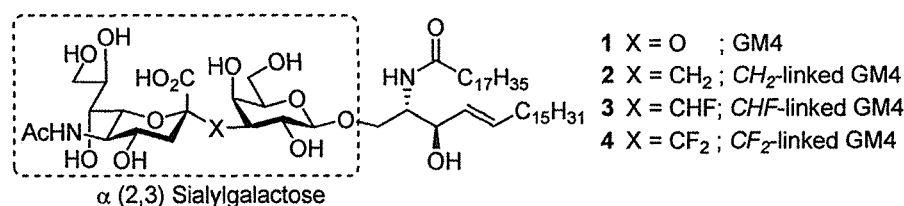
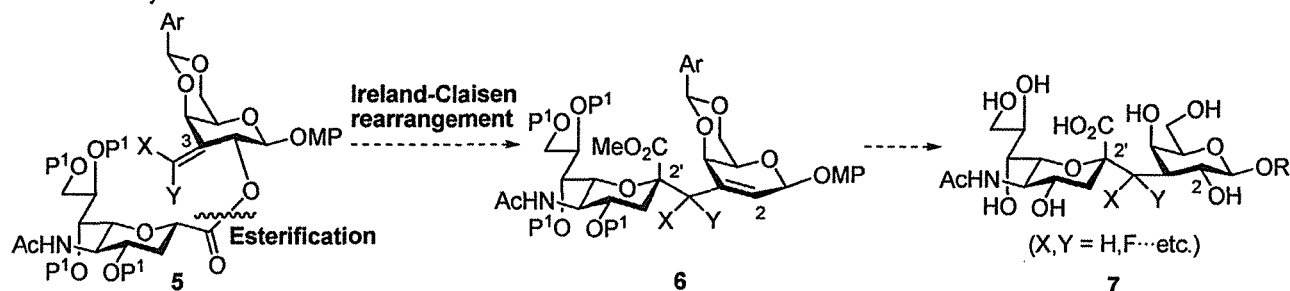


Figure 1. GM4 (1) and Novel Types of GM4 Analogues (2, 3, 4).

【合成計画】GM4 アナログの重要なコア構造となる炭素連結型 $\alpha(2,3)$ シアリルガラクトース **7** をいかに効率よく合成できるかが本研究のポイントとなる。構築の難しい 2'位の 4 置換炭素をエステル **5** の Ireland-Claisen 転位反応により構築しようと考えた (Scheme 1)。生成物 **6** は 2 位水酸基を有してい

ないため、最終段階で酸化的に導入することにした。また、転位反応前駆体 **5** は、3 位に X、Y の置換したエキソメチレン基を有するガラクトース誘導体と 2'-デオキシシアル酸誘導体を縮合することで合成できると考えた。本手法が確立できれば、様々な X,Y に適用可能な一般的なシアル酸 C-グリコシド構築法となることが期待できる。

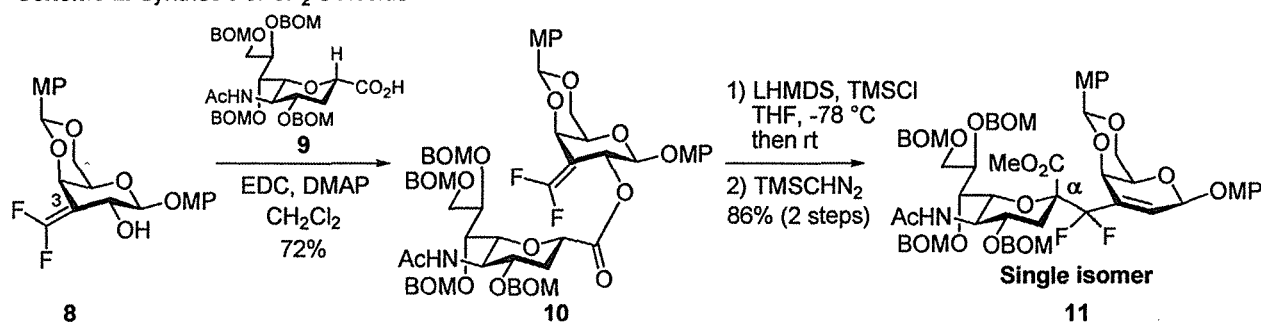
**Scheme 1. Synthetic Plan.**



### 【Ireland-Claisen 転位反応を用いた C-シアロシドの合成】

まず  $CF_2$ -シアロシドの合成を検討した。ガラクトース 3 位にジフルオロメチレン基を導入した **8** と 2'-デオキシシアル酸 **9** を縮合し、転位前駆体 **10** を合成した (Scheme 2)。低温で混合した LHMDS と TMSCl の溶液に **10** を滴下して室温に昇温したところ、速やかに Ireland-Claisen 転位反応が進行し、 $CF_2$  基で連結した 2 糖を得ることに成功した。生じたカルボン酸をメチルエステル **11** として単離したところ、望む立体化学を有する  $\alpha$  体のみが生成していることがわかった。

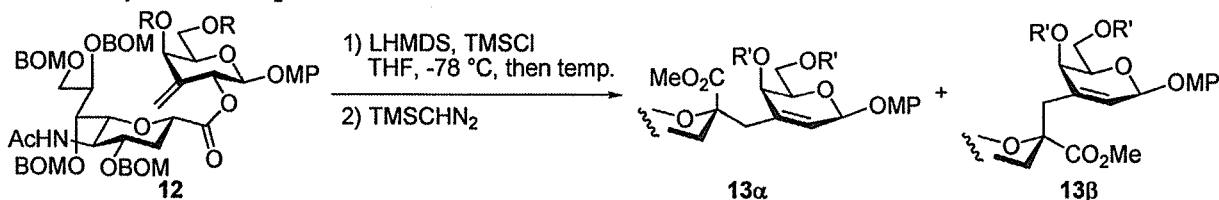
**Scheme 2. Synthesis of  $CF_2$ -sialoside**



続いて  $CH_2$  連結型シアロシドの合成を検討した (Scheme 3)。別途合成した **12a** を基質として同様の転位反応に付したところ、**13a( $\alpha$ )**と **13a( $\beta$ )**の混合物を与えた (5:1, entry 2)。 $\alpha$  選択性の向上を目指し、シリルエノールエーテル生成後の反応温度について検討した。いずれの温度においても反応は  $\alpha$  選択的に進行したが、低温においては収率、選択性共に低かった (entry 1)。反応温度の上昇に伴い選択性は向上し、THF 中加熱還流下において  $\alpha$  体を 10:1 で選択的に得ることができた (entry 3)。次にガラクトース部保護基の異なるエステル **12b-d** について Ireland-Claisen 転位反応を検討した。嵩高い環状シリ

ル基を有するエステル **12c** を基質として転位反応を行うと、選択性が低下した (entry 5)。一方、ジオール **12d** を用いた場合は、反応系中で TMS 化されるものの、最も高い選択性 ( $\alpha:\beta = 15:1$ ) で  $\alpha$ -Cシ  
アロシドを与えた (entry 6)。

**Scheme 3.** Synthesis of  $CH_2$ -sialoside



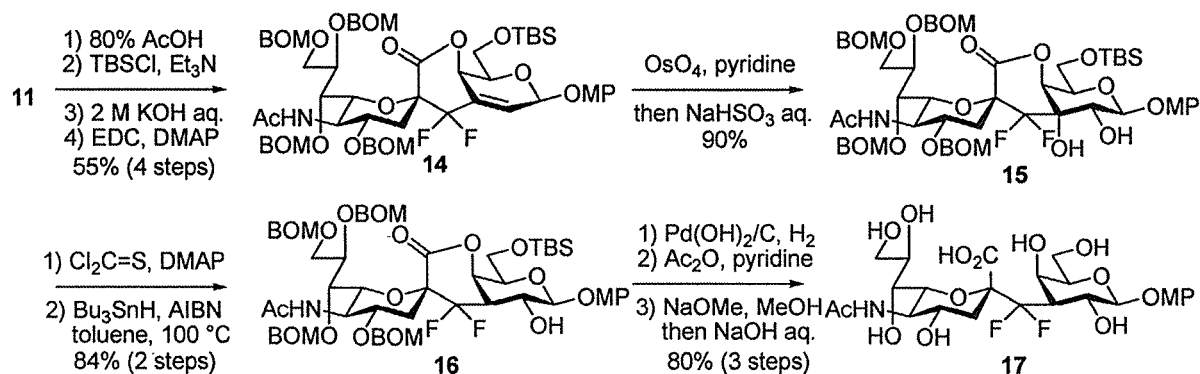
| entry | substrate  | R                                | product    | R'                               | temp. (°C) | ratio ( $\alpha:\beta$ ) <sup>a</sup> | yield (2 steps) |
|-------|------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|------------|---------------------------------------|-----------------|
| 1     | <b>12a</b> | PhCH<                            | <b>13a</b> | PhCH<                            | -20        | 1.8 : 1 <sup>b</sup>                  | 25%             |
| 2     | <b>12a</b> | PhCH<                            | <b>13a</b> | PhCH<                            | rt         | 5 : 1                                 | 73%             |
| 3     | <b>12a</b> | PhCH<                            | <b>13a</b> | PhCH<                            | reflux     | 10.1 : 1 <sup>b</sup>                 | 66%             |
| 4     | <b>12b</b> | MPCH<                            | <b>13b</b> | MPCH<                            | reflux     | 10 : 1                                | 86%             |
| 5     | <b>12c</b> | <sup>t</sup> Bu <sub>2</sub> Si< | <b>13c</b> | <sup>t</sup> Bu <sub>2</sub> Si< | reflux     | 7 : 1                                 | 92%             |
| 6     | <b>12d</b> | H                                | <b>13d</b> | Me <sub>3</sub> Si               | reflux     | 15 : 1                                | 82%             |

a) Ratio was determined by <sup>1</sup>H-NMR unless otherwise noted. b) Ratio was determined by HPLC.

### 【CF<sub>2</sub>連結型シアリルガラクトースの合成】

CF<sub>2</sub>シアロシド **11** からシアリルガラクトース骨格への誘導を検討した。二重結合の反応性は予想外にも低く、ヒドロホウ素化やエポキシ化は進行しなかった。種々検討した結果、化学量論量の OsO<sub>4</sub> をピリジン中で処理すると、高収率かつ高選択的にジオール体を与えることがわかった。余分に導入した 3 位水酸基を効率よく除去するため、**11** を 4 工程でラクトン **14** とした後にジオール **15** へと誘導した (Scheme 4)。15 をチオカーボネートへ変換した後、AIBN、Bu<sub>3</sub>SnH と処理すると 3 級水酸基が還元的に除去されたアルコール **16** を立体選択的に得ることができた。最後に保護基を除去し、CF<sub>2</sub> 連結型シアリルガラクトース **17** の合成に成功した。

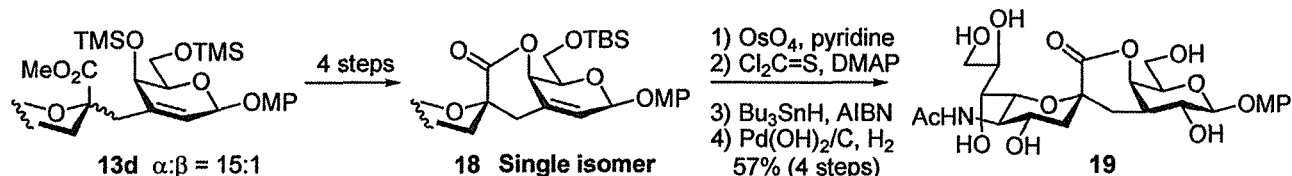
**Scheme 4.** Synthesis of CF<sub>2</sub>-linked Sialylgalactose



### 【CH<sub>2</sub>連結型シアリルガラクトースの合成】

CH<sub>2</sub>連結型の Claisen 転位成績体 **13d** を 4 工程でラクトン **18** へ変換した。ラクトン化を経由することで $\alpha$ 体のみを得ることができた。CF<sub>2</sub> 体の場合と同様にジオール化、3 級水酸基のラジカル還元反応を経由し、CH<sub>2</sub>連結型シアリルガラクトースラクトン **19** の合成に成功した (Scheme 5)。

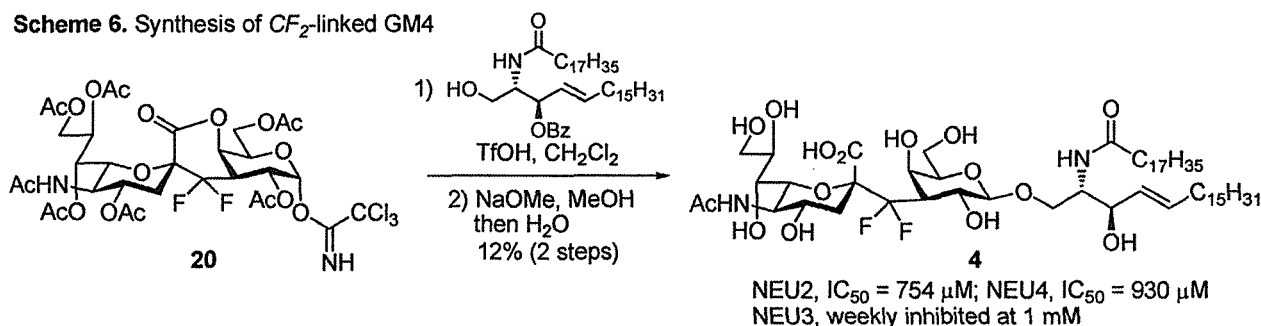
**Scheme 5.** Synthesis of CH<sub>2</sub>-linked Sialylgalactose Lactone



#### 【ガングリオシドアナログの合成とシアリダーゼ阻害活性】

GM4 アナログへ導くため、CF<sub>2</sub> 連結型シアリルガラクトースを糖供与体としたグリコシル化反応を検討した。**16** から 4 工程でトリクロロアセトイミデート **20** へと変換した後、セラミド誘導体とのグリコシル化により GM4 アナログ **4** を低収率ながら合成することに成功した (Scheme 6)。シアリダーゼ阻害試験の結果、**4** は GM4 を基質とするヒトシアリダーゼ NEU2、NEU3、NEU4 に対して阻害活性を示した。また、**4** は GM4 と同等のヒトリンパ球増殖抑制活性を示したことから、加水分解されないガングリオシドアナログとして機能することが示唆された。

**Scheme 6.** Synthesis of CF<sub>2</sub>-linked GM4



【総括】本研究では生体内で安定なガングリオシドアナログを創製することを志向し、Ireland-Claisen 転位反応を鍵とした  $\alpha$ -シアロシド合成法の開発および CF<sub>2</sub> 連結型 GM4 アナログ **4** の創製に成功した<sup>1)</sup>。**4** は安定ガングリオシドアナログとして機能することが示唆され、今後ガングリオシドやシアリダーゼの機能を解明するためのツールとなることが期待される。

# 論文審査結果の要旨

糖脂質、なかでもガングリオシドは生体内で重要な働きをしており、ガングリオシドが生体においてはたす役割の解明は科学的にたいへん重要な問題である。しかしガングリオシド類は分解と合成のバランスによるダイナミックな制御をうけており、個々のガングリオシドの機能解明は簡単ではない。従って分解をうけないガングリオシドアナログは機能研究の為のプロープとして有用であると期待される。また、ガングリオシドを特異的に分解するシアリダーゼの一種である NEU3 の発現が癌細胞において亢進している事が見いだされており、その阻害剤の創製は新たな作用機序による抗がん剤開発に繋がる可能性ももつ。本論文は、NEU3 の基質であるガングリオシド GM3 や GM4 の基本ユニットである  $\alpha$  (2, 3) シアリルガラクトースに着目し、その加水分解をうけないアナログとして炭素結合型シアリルガラクトースユニットを設計し、その合成法の開発を行い、さらにそれを用いて  $\text{CF}_2$  連結型 GM4 アナログの合成と評価を行った結果についてまとめたものである。

本論文は全編 7 章より構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景となるガングリオシドやシアリダーゼについて解説し、さらにはその非加水分解性アナログとしての炭素連結型シアリルガラクトースユニットの設計について述べている。

第 2 章は  $\text{CH}_2$ -シアロシドに加え、既存の方法の応用では合成できない  $\text{CF}_2$ -ならびに  $\text{CHF}$ -シアロシドの合成にも適用可能な、Ireland-Claisen 転位反応を鍵反応とする新しい合成法の開発について述べている。炭素連結型シアロシド合成では、混み合った 4 置換炭素の立体化学を制御する必要がある。本方法では  $\text{CF}_2$ -ならびに  $\text{CH}_2$ -シアロシドのどちらの場合も高立体選択的で効率の良い合成を実現しており、高く評価できる。

第 3 章は第 2 章で開発した方法を用いた  $\text{CF}_2$  連結型シアリルガラクトースの合成について述べている。

第 4 章は第 2 章で開発した方法を用いた  $\text{CH}_2$  連結型シアリルガラクトースの合成について述べている。

第 5 章は  $\text{CHF}$  連結型シアリルガラクトース合成の検討について述べている。

第 6 章は  $\text{CF}_2$  連結型シアリルガラクトースへのセラミドユニットの導入による GM4 アナログの合成について述べている。さらに合成した  $\text{CF}_2$  連結型 GM4 アナログの 4 種のシアリダーゼ (NEU1, NEU2, NEU3, NEU4) に対する阻害活性、ならびにリンパ球増殖抑制試験の結果についても述べている。合成された新規な  $\text{CF}_2$  連結型 GM4 アナログは、ガングリオシドを基質とするシアリダーゼを選択的に阻害した。さらにリンパ球増殖抑制試験においては GM4 と同等の増殖抑制を示したことから、優れた GM4 ミミックとして機能していることが確かめられた。本結果は、シアロシド結合のアノマー酸素原子を  $\text{CF}_2$  で置換した化合物が優れた活性を示す事を実証した初めての例であり、高く評価できる。

第 7 章は総括である。

以上要するに本論文は、炭素連結型シアロシドの立体化学を制御した新しい合成法の開発と、それを利用した  $\text{CF}_2$  連結型 GM4 アナログの合成、さらにその GM4 ミミックとしての機能の実証を行ったもので、ガングリオシド研究の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。